

明細書

新規 N-アセチルグルコサミン転移酵素、それをコードする核酸並びにこれらの癌及び／又は腫瘍診断用途

技術分野

5 本発明は、Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1, 3 結合で転移する活性を有する新規な酵素及びそれをコードする核酸、並びに該核酸を測定するための核酸に関する。さらに本発明は、前記酵素又はその遺伝子の発現量を指標とする癌又は腫瘍診断に関する。

背景技術

10 Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1, 3 結合で転移する活性を有する、ポリラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有する酵素は、現在までに 5 種類同定されている (Togayachi, A. 等, J Biol Chem, 2001, 276, 22032-40, Shiraishi, N. 等, J Biol Chem, 2001, 276, 3498-507, Sasaki, K 等, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94, 14 294-9)。しかし、これらの遺伝子を細胞に発現させるとポリラクトサミンが細胞表面に増加するが、発現酵素にするとその活性は非常に弱いものも存在する。すなわち、ポリラクトサミンを作る酵素は、それぞれ違った特徴を備えていると考えられるが、未だこの酵素の特徴付けは十分ではない。従って、この酵素活性を必要とするポリラクトサミン糖鎖構造の作製または製造は、化学合成するか、20 生体成分より分離するか、または、酵素学的に組織ホモジネートを使用して合成しなければならない。

ポリラクトサミン糖鎖を基幹とする糖鎖構造上にはルイス抗原などの糖鎖構造があることが知られている (Kannagi R. Glycoconj J. 1997 Aug;14(5):577-84. Review; Nishihara S et al., J Biol Chem. 1994 Nov 18;269(46):29271-8)。同様にポリラクトサミン糖鎖の長さなどの構造が癌転移、NK 細胞などをはじめとした細胞免疫機能に関係していると言われている (Ohyama C et al., EMBO J. 1999 Mar 15;18(6):1516-25.)。同様にヘリコバクターピロリ菌はルイス抗原などの関連糖鎖を介してヒト胃組織に感染することが知られている (Wang G et al.

, Mol Microbiol. 2000 Jun;36(6):1187-96. Review: Falk PG et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 28;92(5):1515-9。従って、もし、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ または $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを $\beta-1,3$ 結合で転移する活性を有する酵素遺伝子をクローニングでき、また、該遺伝子を利用して遺伝子工学的に該酵素を生産できるようになれば、該酵素に対する抗体も生産可能となる。従って、これらは癌、免疫病及びピロリ菌感染症の診断、治療及び予防に有用である。しかしながら、該酵素は、未だ精製分離もされておらず、該酵素の単離及び遺伝子の同定についての手がかりはない。そのために、該酵素に対する抗体も作製されていない。

10

発明の開示

従って、本発明の目的は、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ または $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを $\beta-1,3$ 結合で転移する活性を有する酵素及びそれをコードする核酸を提供することである。また、本発明の目的は、該核酸を宿主細胞内で発現する組換えベクター及び該核酸が導入され、前記核酸および酵素タンパク質を発現する細胞および酵素タンパク質を提供することである。さらに、本発明の目的は、上記本発明の核酸を測定するための測定用核酸を提供することおよび活性を有する該酵素の生産法を提供するものである。

15

上記の通り、目的とする酵素は、未だ単離されていないので、その部分アミノ酸配列を知ることもできない。一般に、細胞に微量しか含まれていないタンパク質を単離精製することは容易ではなく、現在に至るまで単離されていない酵素を細胞から単離することは容易でないことが予想される。本願発明者は、目的とする酵素と比較的類似した作用を有する種々の酵素遺伝子の塩基配列間に、もしも相同性の高い領域が存在していれば、目的とする酵素の遺伝子もその相同配列を有しているかもしれないと考えた。そして、公知の $\beta 1, 3-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、 $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素および $\beta 1, 3-N$ -アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子等の塩基配列を検索した結果、相同的な領域が見つかった。そこで、この相同領域にプライマーを設定して cDNA ライブラーーから PCR でクローニングすることを基本として種々検討した結果、該

酵素の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列及び推定アミノ酸配列を決定することができ、本発明に至った。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ または $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを $\beta-1,3$ 結合で転移する活性を有するタンパク質を提供する。

また、本発明は、該タンパク質をコードする核酸を提供する。さらに、本発明は、該核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、該組換えベクターにより形質転換され、前記核酸を発現する細胞を提供する。さらに、本発明は、核酸と特異的にハイブリダイズする、該核酸の測定用核酸を提供する。さらに、本発明は、該測定用核酸の癌又は腫瘍の診断用途を提供する。さらに、本発明は、生体から分離された試料細胞中における、上記酵素又はその遺伝子の発現量を調べることを含む、癌又は腫瘍の診断方法を提供する。さらに本発明は、上記本発明の核酸測定用核酸と、上記本発明の核酸とをアニーリングすることによりハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした核酸を測定することを含む、上記本発明の核酸の測定方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸測定用核酸の、上記本発明の核酸の測定用核酸製造のための使用を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸測定用核酸の、癌及び／又は腫瘍の診断試薬製造のための使用を提供する。

本発明により、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ または $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを $\beta-1,3$ 結合で転移する活性を有する酵素及びそれをコードする核酸が初めて提供された。また、本発明により、該核酸を測定するための核酸がはじめて提供された。さらに、本発明により、該酵素又はその遺伝子の発現量を指標とする、癌又は腫瘍、とりわけ消化器の癌又は腫瘍の簡便で正確な診断方法及びそれに用いられる測定用核酸が初めて提供された。したがって、本発明は、消化器癌や腫瘍の診断に大いに貢献するものと期待される。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の遺伝子を導入した組換えベクター又は導入しない組換えベクター形質転換した HCT15 大腸癌細胞株の LEA レクチンとの結合性を示すフローサイトメトリーの結果を示す。

図 2 は、本発明の遺伝子を導入した組換えベクター又は導入しない組換えベクター形質転換した LSC 大腸癌細胞株の LEA レクチンとの結合性を示すフローサイトメトリーの結果を示す。

図 3 は、本発明の遺伝子を導入した組換えベクター又は導入しない組換えベクター形質転換した HCT15 大腸癌細胞株の WGA レクチンとの結合性を示すフローサイトメトリーの結果を示す。

図 4 は、大腸癌患者の正常組織及び癌組織中における、本発明の遺伝子の発現量を比較して示す図である。

発明を実施するための最良の形態

下記実施例において詳述する方法により、ヒト幽門洞(antrum) cDNA ライブラリーからクローニングされた、本発明のタンパク質をコードする核酸から開始コドン(ATG)を除いた核酸は、配列表の配列番号 4 に示される塩基配列を有し、それがコードする推定アミノ酸配列が、該塩基配列の下に記載されている。配列番 3 には、該アミノ酸配列のみを取り出して示す。配列番号 4 に示される塩基配列を有する核酸は、下記実施例において、発現ベクターに組み込まれ、昆虫細胞中で発現され、実際に、上記酵素活性を有するタンパク質が生産されることが確認されている。配列番号 3 に示されるアミノ酸配列と、他の類似の酵素（具体的な酵素名： β -1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子の beta3GnT2 : AB049584）のアミノ酸配列とを比較、検討した結果、比較的ホモロジーの高い領域、すなわち、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列中の第 45 番目のアミノ酸から C 末端までの領域が酵素活性ドメインであると考えられ、この 283 アミノ酸から成る領域が含まれていれば上記酵素活性が発揮されると考えられる。この 283 アミノ酸を取り出して配列番号 1 に示し、また、これをコードする核酸を配列番号 4 から取り出して配列番号 2 に示す。

下記実施例で得られた本発明のタンパク質（「beta3GnT-7」と命名）は、次の

性質を有する酵素である。なお、各性質及びその測定方法は下記実施例において詳述されている。

作用： Gal β 1-4Glc または Gal β 1-4GlcNAc 基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1,3 結合で転移する。触媒する反応を反応式で記載すると UD

5 P-N-アセチル-D-グルコサミン + β -D-ガラクトシル-1,4-D-グルコシル-R

→ UDP + N-アセチル- β -D-グルコサミニル-1,3- β -D-ガラクトシル-1,4-D-グルコシル-R、または、 UDP-N-アセチル-D-グルコサミン + β -D-ガラクトシル-1,

4-N-アセチル-D-グルコサミニル-R

→ UDP + N-アセチル- β -D-グルコサミニル-1,3- β -D-ガラクトシル-1,4-N-アセチル-D-グルコサミニル-R

10 基質特異性： Gal β 1-4Glc または Gal β 1-4GlcNAc 基。生体物質では、例えば、糖蛋白質 (O-グリカン、N-グリカン) や糖脂質 (ラクト・ネオラクト系列糖鎖など) 上のポリラクトサミン構造を始めとして多数存在しており、またプロテオグリカン (ケラタン硫酸) などの基幹構造等に含まれる Gal β 1-4Glc または Gal β 1-4GlcNAc 基。

15 なお、一般に、酵素のような生理活性を有するタンパク質において、そのアミノ酸配列のうち、1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加された場合であっても、該生理活性が維持されることがあることは周知である。従って、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ配列において 1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、 Gal β 1-4Glc または Gal β 1-4GlcNAc 基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1,3 結合で転移する活性を有するタンパク質 (以下、便宜的に「修飾タンパク質」) も本発明の範囲に含まれる。このような修飾タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列と 70% 以上、好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の相同性を有することが好ましい。なお、アミノ酸配列の相同性は、FASTA のような周知のコンピューターソフトを用いて容易に算出することができ、このよ

うなソフトはインターネットによっても利用に供されている。さらに、該修飾タンパク質としては、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列又は該配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に 1 若しくは数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有するものが特に好ましい。さらに、配列番号 1 若しくは 3 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質又はこれらの修飾タンパク質を含むタンパク質であって、Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1,3 結合で転移する活性を有するタンパク質も当然、本発明の範囲に含まれる。例えば、下記実施例では、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の上流に、膜貫通領域を含む領域が結合された、膜結合型の酵素をコードする核酸もクローニングされたが、このような膜結合型の酵素も当然本発明の範囲に含まれる。

本発明は、配列番号 1 又は配列番号 3 で示されるアミノ酸配列をコードする核酸及び上記修飾タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸も提供する。核酸としては DNA が好ましい。なお、周知の通り、コドンには縮重があり、1 つのアミノ酸をコードする塩基配列が複数存在するアミノ酸もあるが、上記アミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、いずれの塩基配列を有するものも本願発明の範囲に含まれる。なお、下記実施例において実際にクローニングされた cDNA の塩基配列が配列番号 2 および配列番号 4 に示されている。配列番号 2 又は配列番号 4 に示す塩基配列を有する核酸とストリンジエントな条件下(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS 又は 0.1% SDS といった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて 50 ~ 65°C で反応を行なう)において、ハイブリダイズし、かつ、上記修飾タンパク質をコードする核酸も本発明の範囲内に入る。

上記本発明の核酸は、下記実施例に詳述する方法により調製することもできるし、また、本発明によりその塩基配列が明らかにされたので、下記実施例で用いているヒト幽門洞を材料として用い、常法である RT-PCR 法を行うことにより容易に調製することができる。また、上記本発明のタンパク質は、例えば下記実施例に詳述するように、上記本発明の核酸を発現ベクターに組み込み、宿主細胞中

で発現させ、精製することにより容易に調製することができる。

上記本発明の核酸を、発現ベクターのクローニング部位に挿入することにより、宿主細胞中で上記核酸を発現させることができる組換えベクターを得ることができる。発現ベクターとしては、種々の宿主細胞用の種々のプラスミドベクター及びウイルスベクターが周知であり、市販もされている。本発明では、このような市販の発現ベクターを好ましく用いることができる。また、このような組換えベクターで宿主細胞を形質転換又は形質導入する方法も周知である。本発明はまた、該核酸が形質転換、形質導入又はトランスフェクション等により宿主細胞に導入され、該核酸を発現する細胞を提供する。宿主細胞に外来遺伝子を導入する方法自体は周知であり、上記組換えベクターを用いること等により容易に行うことができる。宿主細胞としては、特に限定されず、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母、細菌等を用いることができる。なお、組換えベクターの構築及びそれを用いて本発明の核酸を宿主細胞に導入する方法の具体例が下記実施例に詳述されている。

なお、本発明のタンパク質は、そのアミノ酸配列が上記した通りのものであり、上記した酵素活性を有するものであれば、タンパク質に糖鎖が結合していてよい。すなわち、本発明の「タンパク質」は「糖タンパク質」をも包含する。

本発明により、本発明の新規酵素のcDNAの塩基配列が明らかになったので、該酵素のmRNA又はcDNAと特異的にハイブリダイズする、前記本発明の測定用核酸（以下、単に「測定用核酸」）が本発明により提供された。ここで、「特異的」とは、検査対象となる細胞中に存在する他の核酸とハイブリダイズせず、上記本発明の核酸とのみハイブリダイズするという意味である。測定用核酸は、上記本発明の核酸、とりわけ配列番号2又は4に示される塩基配列を有する核酸中の部分領域と相同意味の配列を有することが一般的に好ましいが、1～2塩基程度の不一致があっても差し支えないことが多い。測定用核酸は、プローブ又は核酸增幅法におけるプライマーとして用いることができる。特異性を確保するため、測定用核酸の塩基数は15塩基以上、さらに好ましくは18塩基以上である。サイズは、プローブとして用いる場合には、15塩基以上、さらに好ましくは20塩基以上、コード領域の全長以下が好ましく、プライマーとして用いる場合に

は、15塩基以上、さらに好ましくは18塩基以上、50塩基以下が好ましい。
被検核酸の部分領域と相補的な配列を有する核酸をPCRのような遺伝子増幅法
のプライマー、又はプローブとして用いて被検核酸を測定する方法自体は周知で
あり、下記実施例には、ヒト細胞中の本発明の酵素のmRNAをノーザンプロッ
ト及びインサイチューハイブリダイゼーションにより測定した方法が具体的に詳
述されている。なお、本明細書において、「測定」には、検出、定量、半定量の
いずれもが包含される。

PCRのような核酸増幅法自体は、この分野において周知であり、そのための
試薬キット及び装置も市販されているので容易に行うことができる。すなわち、
例えは、鑄型となる被検核酸（例えは、本発明の酵素の遺伝子のcDNA）と本
発明の測定用核酸（プライマー）の一対とを、緩衝液中で、Taqポリメラーゼ及
びdNTPの存在下で、変性、アニーリング、伸長の各工程を反応液の温度を変化
させることにより行う。通常、変性工程は、90～95°C、アニーリング工程は、
鑄型とプライマーのT_m又はその近傍（好ましくは±4°C以内）、伸長工程はTa
qポリメラーゼの至適温度である72°Cで行われる。各工程は30秒～2分程度
で適宜選択される。この熱サイクルを例えは25～40回程度繰り返すことによ
り、一対のプライマーで挟まれた鑄型核酸の領域が増幅される。なお、核酸増幅
法はPCRに限定されるものではなく、この分野において周知の他の核酸増幅法
も用いることができる。このように、上記した本発明の測定用核酸の一対をプ
ライマーとして用い、被検核酸を鑄型として用いて核酸増幅法を行うと、被検核酸
が増幅されるのに対し、検体中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きない
ので、増幅産物を検出することにより検体中に被検核酸が存在するか否かを知る
ことができる。増幅産物の検出は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエ
チジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の
固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブとハイブ
リダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。また、
クエンチャーフィル光色素とレポーター蛍光色素を用いたいわゆるリアルタイム検出
PCRを行うことにより、検体中の被検核酸の量を定量することも可能である。

なお、リアルタイム検出PCR用のキットも市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて被検核酸を半定量することも可能である。なお、被検核酸は、mRNAでも、mRNAから逆転写したcDNAであってもよい。被検核酸としてmRNAを増幅する場合には、上記一対の5 プライマーを用いたNASBA法(3SR法、TMA法)を採用することもできる。NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一対のプライマーを用いて容易に実施することができる。

プローブとしては、上記測定用核酸に蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の10 標識を付した標識プローブを用いることができる。核酸の標識方法自体は周知である。被検核酸又はその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、15 洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中に被検核酸が存在するか否かを調べることができる。あるいは、測定用核酸を固相化し、被検核酸をハイブリダイズさせ、固相に結合した被検核酸を標識プローブ等で検出することも可能である。このような場合、固相に結合した測定用核酸もプローブと呼ばれる。なお、核酸プローブを用いた被検核酸の測定方法もこの分野において周知20 であり、緩衝液中、核酸プローブを被検核酸とTm又はその近傍(好ましくは±4°C以内)で接触させることによりハイブリダイズさせ、洗浄後、ハイブリダイズした標識プローブ又は固相プローブに結合された鑄型核酸を測定することにより行うことができる。このような方法には、下記実施例に記載されるノーザンプロットやインサイチューハイブリダイゼーション、さらにはサザンプロット法等の周知の方法が含まれる。

本発明の酵素を、Gal β 1-4GlcまたはGal β 1-4GlcNAc-基を有する糖タンパク質、オリゴ糖、糖脂質又は多糖等に作用させることにより、Gal β 1-4GlcまたはGal β 1-4GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンが β -1,3結合で結合される。従って、本発明の酵素は、糖タンパク質の糖鎖の修飾、糖脂質の糖鎖の修飾や、糖類の合成に用いることができる。さらに、この酵素を免疫原として動物に投与することにより、該酵素に対する抗体を作製することができ、該抗体を用いて免疫測定法により該酵素を測定することが可能になる。従って、25

本発明の酵素及びこれをコードする核酸は、このような免疫原の作製に有用である。このような抗体及び上記した測定用核酸は、生体中の該酵素を測定することに有用であり、該測定は、癌、免疫病及びピロリ菌感染症の診断、治療及び予防に有用である。

5 本発明の酵素と抗原抗体反応する抗体、好ましくはモノクローナル抗体は、本発明の酵素を免疫原として動物に投与することを含む周知の方法により作製することができる。このような抗体は、癌又は腫瘍、好ましくは消化器系の癌又は腫瘍、特に大腸の癌又は腫瘍、さらに好ましくは大腸癌の診断に用いることができる。抗体を癌又は腫瘍の診断に用いる場合、試料となる細胞中の上記酵素と、該抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定方法により、上記酵素を測定し、正常細胞における測定結果と比較し、酵素の測定量が正常細胞よりも少なければ、特に、酵素が検出されなければ、癌又は腫瘍の可能性が高いと診断することができる。免疫測定方法自体は、周知であり、周知のいずれの免疫測定方法をも採用することができる。すなわち、測定形式で分類すれば、サンドイッチ法、競合法、凝集法、ウェスタンプロット法などがあり、用いる標識で分類すれば蛍光法、酵素法、放射法、ビオチン法等があるが、これらのいずれをも用いることができる。さらに、免疫組織染色によって診断することもできる。免疫測定方法に標識抗体を用いる場合、抗体の標識方法自体は周知であり、周知のいずれの方法をも採用することができる。また、周知のとおり、抗体をパパイン分解やペプシンで分解することにより、 Fab フラグメントや $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントのような、対応抗原との結合性を有する抗体断片（本明細書において「抗原結合性断片」という）が得られることが知られているが、本発明の抗体の抗原結合性断片も本発明の抗体と同様に用いることができる。

10 15 20 25

なお、これらの免疫測定法自体は周知であり、本明細書で説明する必要はないが、簡単に記載すると、例えば、サンドイッチ法では、本発明の抗体又はその抗原結合性断片を第1抗体として固相に不動化し、検体と反応させ、洗浄後、本発明の酵素と抗原抗体反応する第2抗体を反応させ、洗浄後、固相に結合した第2抗体を測定する。第2抗体を酵素、蛍光物質、放射性物質、ビオチン等で標識し

ておくことにより固相に結合した第2抗体を測定することができる。濃度既知の複数の標準試料中について上記方法により測定し、測定された標識量と標準試料中の本発明の酵素の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の被検試料についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、被検試料中の本発明の酵素を定量することができる。なお、第1抗体と第2抗体を上記の説明と入れ替えてよい。また、凝集法では、ラテックス等の粒子に本発明の抗体又はその抗原結合性断片を不動化し、検体と反応させて吸光度を測定する。濃度既知の複数の標準試料中について上記方法により測定し、測定された標識量と標準試料中の本発明の酵素の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の被検試料についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、被検試料中の本発明の酵素を定量することができる。

また、各免疫測定に必要な試薬類も周知であり、用いる抗体に特徴があること以外は、通常の免疫測定キットを用いて免疫測定を行うことができる。例えば、通常、緩衝液、固相、標識第2抗体等が含まれる。

下記実施例に具体的に記載するように、本発明の酵素の発現量を指標として癌及び／又は腫瘍の診断を行うことができる事が確認されたので、本発明は、生体から分離された試料細胞中における、上記本発明の酵素の遺伝子の発現量を調べることを含む、癌又は腫瘍の診断方法をも提供するものである。なお、下記実施例に具体的に示されるように、本発明の診断方法により検出可能な腫瘍は、癌又は癌が強く疑われる腫瘍である。前記試料細胞としては、消化器系器官の細胞が好ましく、特に大腸由来の細胞が好ましく、これらの細胞を対象とすることで消化器の癌又は腫瘍、特に大腸の癌及び／又は腫瘍の診断を行うことができる。遺伝子の発現量は、細胞中の、該遺伝子から転写されたmRNA若しくは該mRNAを鑄型として作製されたcDNAの量を調べることによって測定することができるし、試料細胞中で生産された酵素を、上記本発明の抗体を用いた免疫測定法により測定することによっても測定することができる。mRNA又はcDNAの量の測定は、上記した本発明の測定用核酸を用いて、上記のようにして行うことができる。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、下記の記述において、例えば配列表の配列番号5で表される塩基配列を有する核酸を、便宜的に「配列番号5」のように記載することがある)。

5 1. 遺伝子データベースの検索と beta3GnT-7 の塩基配列決定

既存の β -1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、 β -1, 3-ガラクトース転移酵素および β -1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子を用いて、遺伝子データベースから類似遺伝子の検索を行った。用いた配列は β -1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子 AB049584、AB049585、AB049586、AB045278、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の配列 AF117222、Y15060、Y15014、AB026730、AF145784、AF145784、1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子の配列 Y15062 (すべて Gene Bank 登録番号) で、プロ

10 グラムは BLAST の t Blastn を使用し、ORF (Open Reading Frame) に相当するアミノ酸全てについて検索を行った。

15

その結果、EST 配列 Gene Bank Accetion No. AK000770 とヒトゲノム配列 Gene Bank accetion No. AC017104 が見出された。そこで AC017104 を用いてライ

20 ブラリーのスクリーニングを行った。

用いたサンプルは常法 (Yuzuru Ikebara, Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) により作製したヒト Antrum (幽門洞) cDNA ライブラリーである。また、スクリーニング手法はラジオアイソトープを使用した一般的な核酸プローブによる方法を用いた。具体的には以下に述べるとおりである。

25 まず、ヒト Antrum (幽門洞) cDNA ライブラリーより常法に従って調製したラムダファージを鑄型とし、プライマー CB-635 (5' -cagca gctgc tggcc tacga agac- 3') (AC017104 における塩基番号 6814-6837) と CB-638 (5' -gcaca tgccc agaaa gacgt cgtc- 3') (塩基番号 7221-7245) を用いて PCR を行い、増幅した DNA 断片約 430 bp を Amersham 社製 Multiple DNA labeling system を用いて

³²P-dCTP で放射能ラベルした。

このプローブを用いて、大腸菌上に形成されたラムダファージのplaquesのうち、プローブとハイブリダイゼーションする单一のplaquesを拾い、上記プライマーCB635とCB638を用いてPCRで目的とするDNA部位の存在を確認した。挿入が確認されたplaquesより得られたファージはLamda ZAP IIベクター（ストラタジーン社）で構築されているため（Yuzuru Ikebara, Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999）、付属の説明書に従つた方法によりpBluescript SKベクターに挿入されたcDNAクローンとして調製（Excision）することが出来る。同方法によりこれを調製し、得られたコロニーによりDNAを得た。その後、通常の方法に従つてcDNAクローンの塩基配列を決定した（配列番号6）。

上記方法で得られた配列番号6はAC017104の塩基番号4828から7052に該当し、ORFの3'側が欠けていたため、3'側をcDNAからPCRでクローニングしてつなげることとした。即ち、コンピューターによる検索結果のAC017104より予想される配列から終止コドンの後の配列でプライマーCB-625 (5'-cgttc ctggg c ctca gtttc ctag-3') (塩基番号7638-7661) を設計し、上記CB635と組み合わせて上記ヒトAntrum(幽門洞)cDNAライブラリーよりDNA断片を得た。常法によりこのDNA断片の塩基配列を決定したところ、配列番号7(AC017104における6814-7661)（以下配列3という）が得られた。これを配列番号6と組み合わせ、理論上のORF 987bp (AC017104における6466-7452) が得られ、このORFから328アミノ酸が推定されbeta3GnT-7と名づけた（配列番号8）。一般的には、糖転移酵素は2型の膜1回貫通タンパクであることが知られているが、このORF配列には、N末端には疎水性領域が見出されなかった。しかし、ヒト血清中にβ1,3-N-アセチルグルコサミニル転移酵素活性が検出されることが報告されていることから（Human Serum Contains N-Acetyl lactosamine: β1,3- N-Acetylglucosaminyltransferase Activity. Hosomi, O., Takeya, A., and Kogure, T. J. Biochem. 95, 1655-1659(1984)）、おそらくこのORFは膜貫通領域が無い分泌型酵素であると考えられた。

この配列番号 8 による ORF とそれがコードするアミノ酸が実際に存在し、機能している（＝発現している）ものであることを示すため、RT-PCR と、PCR 増幅産物の制限酵素による確認および PCR 増幅産物の配列のダイレクトシークエンシング（通常の方法）による mRNA の確認を行った。その結果上記理論上の ORF が確かに存在し、実際に機能していることが確認された。

また、上述のように、糖転移酵素は通常 2 型の膜貫通タンパク質であることが知られているが、配列番号 8 のアミノ酸配列の N 末側に疎水性領域が無く、一般的な糖転移酵素とは異なっていると考えられた。そこで、N 末側に疎水性領域（膜貫通領域）を持つスプライシングバリエントがさらに存在するか否か、5' - 側の核酸配列（＝アミノ酸配列の N 末端側）について解析を行なった。

まず、Human stomach Marathon- Ready cDNA（クロントック社）を鑄型として 5' -RACE (Rapid amplification of cDNA ends) を行なった。具体的には、Marathon cDNA 付属の AP1 プライマーと（DNA 断片の両側に AP1、さらにその両内側に AP2 のアダプターがついている）、見出した配列部分に設定したプライマー beta3GnT-7RACE-5 (5'- GACCG ACTTG ACAAC CACCA GCA -3') で PCR (94°C 60 秒、9 15 4°C 30 秒-72°C 3 分を 5 サイクル、94°C 30 秒-70°C 3 分を 5 サイクル、94°C-68°C 3 分を 25 サイクル) を行い、その DNA 産物についてさらに、Marathon cDNA 付属の AP2 プライマーと、配列部分に設定したプライマー beta3GnT-7RACE-4 (5'- GTAGA CATCG CCCCT GCACT TCT -3') で nested PCR (94°C 60 秒、94°C 30 秒-72°C 3 分を 5 サイクル、94°C 30 秒-70°C 3 分を 5 サイクル、94°C-68°C 3 分を 15 サイクル) を行なった。これを pGEMeasy（クロントック社）にクローニングして塩基配列を決定した。その結果、先に見出した配列番号 6 の開始コドンより上流部分の配列が得られ、アミノ酸配列にすると膜貫通領域が認められた。しかし、この膜貫通領域の配列近傍の 5' - 側の核酸配列を解析したが、ORF の開始点は認められなかった。

そこで、beta3GnT-7 を含むヒトゲノム配列 AC017104 を遺伝子領域解析ソフトの GeneScan、HMMgene 等を用いて翻訳領域を解析した。その結果、開始コドンを含み、11 塩基（約 3 アミノ酸）の第一エクソン（AC017104 の塩基番号 4331-4

341) が予測された。そこで、開始コドンより前の部分にプライマーを設計して PCR を行い、予測された領域がトランスクriptとして存在するかどうか確認することにした。

具体的には、プライマーとして beta3GnT-7RACE-8 (5'- GCCCA GAGCT GCGAG CCG CT -3') (AC017104 における 4278-4300) と CB-638 (5'- GCACA TGCCC AGAAA GA CGT CG-3') (AC017104 における 7224-7245)、鑄型として Human leukocyte Marathon-Ready cDNA および LA-Taq (TaKaRa) を用いて PCR (95°C 30秒、60°C 30秒、72°C 60秒で 30 サイクル) を行なった。その結果、1046 塩基の増幅産物が得られた。PCR 増幅産物を精製してシークエンスを行ってこの配列を検証したところ、上記翻訳領域の解析で予測されたとおり、第 1 エクソンの 3' 側 (塩基番号 4341) が下流の塩基番号 6258 につながっていることが判明した。

そこでさらに配列番号 6、7 と、この結果を組み合わせて配列番号 5 に示す 1 206 の核酸および配列番号 9 に示す 401 のアミノ酸が得られた。この配列番号 5 は、配列番号 8 (配列番号 6 と配列番号 7 の合成) の塩基配列に上流部分の 15 219 塩基 (73 アミノ酸) (AC017104 における 4331-4341 と 6258-6465) 付加したもので、塩基番号 4342-6257 はスプライスされたと考えられた。配列番号 5 は膜貫通領域 (AC017104 の塩基番号 6265-6322) を含むため、配列番号 5 と配列番号 8 は同じ活性を持つ酵素の膜貫通型と分泌型であると考えられた。

2. beta3GnT-7 の発現ベクターへの挿入

20 beta3GnT-7 の活性を調べるために beta3GnT-7 を昆虫細胞内で発現させた。活性を確認するには配列番号 9 の少なくとも他のファミリー遺伝子と比較的ホモジニーが保たれている 119 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、ここでは beta3GnT-7 (配列番号 9) の 75 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を発現させることとした。

25 そこでインビトロジェン社の Gateway システムの pFastBac に組込み、さらにインビトロジェン社の Bac-to-Bac システムによるバクミドを作成した。

①エントリークローンの作成

beta3GnT-7S プライマー (5' - GGGGA CAAGT TTGTA CAAAA AAGCA GGCTT Cgcct

5 ctcag gggcc ccagg cct- 3') と beta3GnT-7A プライマー 5' - GGGGA CCACT TTGT
A CAAGA AAGCT GGGTC catgg gggct cagga gcaag tgcc-3') (大文字は後述する
GATEWAY 用の付加配列 attL である) 、 鑄型にはスクリーニングによって得られ
た cDNA クローンと PCR によって得られた DNA 断片より生成した beta3GnT-7 クロ
ーン (理論上の ORF 配列を有するクローン) の DNA を用いて PCR を行い、 増幅産
物を得た。

10 この産物を BP クロナーゼ 反応によって pDONR201 へ組込み、「エントリーク
ローン」を作成した。反応は目的とする DNA 断片 5 μ l 、 pDONR201 1 μ l (150ng
) 、 反応緩衝液 2 μ l 、 BP クロナーゼ mix 2 μ l を 25°C で 1 時間インキュベー
トして行った。プロテイナーゼ K を 1 μ l 加えて 37°C 10 分おき反応を終了させ
た。

15 その後上記 mix 全量 (11 μ l) をコンピテントセル (大腸菌 DH5 α) 100 μ l と
混合し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含む LB プレートにまいた。翌
日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認した。さらに確実を期すためシ
ケンシングにより DNA 配列の確認をした後、ベクター (pDONR-beta3GnT-7) を
抽出・精製した。

② 発現クローンの作成

20 上記エントリークローンは挿入部位の両側にラムダファージが大腸菌から切り
出される際の組換部位である attL を持つもので、 LR クロナーゼ (ラムダファー
ジの組換酵素 Int 、 IHF 、 Xis を混合したもの) とデステイネーションベクターと
混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローン
が作成される。具体的工程は以下のとおりである。

25 まずエントリークローン 1 μ l 、 pFBIF を 0.5 μ l (75ng) 、 LR 反応緩衝液 2 μ
l 、 TE4.5 μ l 、 LR クロナーゼ mix 2 μ l を 25°C で 1 時間反応させ、プロテイナ
ーゼ K を 1 μ l 加えて 37°C 10 分インキュベートして反応を終了させた (この組換
え反応で pFBIF-beta3GnT-7 が生成される) 。 pFBIF は、 pFastBac 1 に Ig κ シ
グナル配列 (MHFQVQIFSFLLISASVIMSRG) と精製用の FLAG ペプチド (DYKDDDDK)
を入れたもので、 Ig κ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、 FLAG

ペプチドは精製のため挿入したものである。FLAG ペプチドは 0T3 (5' -gatca tg cat tttca agtgc agatt ttcag cttcc tgcta atcag tgcct cagtc ataat gtcac gt gga gatta caagg acgac gatga caag-3') を鑄型とし、プライマー 0T20 (5' -cgg gatccat gcattttcaa gtgcag-3') と、0T21 (5' -ggaat tcttgt catcg tcgtc ct tg-3') によって得られた DNA 断片を Bam H1 と Eco R1 で挿入した。さらに、G 5 ateway 配列を挿入するため、Gateway Vector Conversion System (インビトロ ジェン社) を用いて Conversion cassette を入れた。

その後上記混合液全量 (11 μ l) をコンピテントセル (大腸菌 DH5 α) 100 μ l と混合し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含む LB プレートにまいた。10 翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認し、ベクター (pFBIF-beta3Gn T-7) を抽出・精製した。

③ Bac-to-Bac システムによるバクミドの作成

続いて Bac-to-Bac システム (インビトロジェン社) を用いて上記 pFBIF- と p 15 FastBac との間で組換えをさせ、昆虫細胞中で増殖可能なバクミド (Bacmid) に G1 0 その他の配列を挿入した。このシステムは Tn7 の組換部位を利用して、バクミドを含む大腸菌 (DH10BAC) に目的遺伝子を挿入させた pFastBac を導入するだけで、ヘルパープラスミドから產生される組換タンパク質によって目的とする遺伝子がバクミドへとりこまれるというものである。またバクミドには lacZ 遺伝子 20 が含まれており、古典的な青 (挿入なし) 一白コロニー (挿入あり) による選択が可能である。

即ち、上記精製ベクター (pFBIF-beta3GnT-7) をコンピテントセル (大腸菌 DH10BAC) 50 μ l と混合し、ヒートショック法の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、Bluo-gal、及び IPTG を含む LB プレートにまき、翌日白い単独コロニーをさらに培養し、バクミドを回収した。

3. バクミドの昆虫細胞への導入

上記白コロニーから得られたバクミドに目的配列が挿入していることを確認した後、このバクミドを昆虫細胞 Sf21 (インビトロジェン社より市販) に導入した。即ち 35mm のシャーレに Sf21 細胞 9×10^5 細胞/2ml (抗生素質を含む Sf-9

00SFM(インビトロジェン社)を加え、27°Cで1時間培養して細胞を接着した。(Solution A) 精製した バクミド DNA 5 μ l に抗生物質を含まない Sf-900SFM(インビトロジェン社)100 μ l 加えた。(Solution B) CellFECTIN Reagent(インビトロジェン社) 6 μ l に抗生物質を含まない SF-900SFM(インビトロジェン社)100 μ l 加えた。その後、Solution A および Solution B を丁寧に混合して 15~45 分間、室温でインキュベートした。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して抗生物質を含まない Sf-900SFM(インビトロジェン社) 2ml を加えた。Solution A と Solution B を混合して作製した溶液(lipid-DNA complexes)に抗生物質を含まない Sf900II 800 μ l を加えて丁寧に混和した。細胞から培養液を吸引し、希釈した lipid-DNA complexes 溶液を細胞に加え、27°Cで5時間インキュベーションした。その後、トランスフェクション混合物を除き、抗生物質を含む Sf-900SFM(インビトロジェン社) 培養液 2ml を加えて 27°Cで 72 時間インキュベーションした。トランスフェクションから 72 時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 3000rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存した(この上清が一次ウイルス液となる)。

T75 培養フラスコに Sf21 細胞 1×10^7 細胞/20ml Sf-900SFM(インビトロジェン社) (抗生物質入り) を入れて、27°Cで1時間インキュベートした。細胞が接着したら一次ウイルスを 800 μ l を添加して、27°Cで 48 時間培養した。48 時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 3000rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存する(この上清を二次ウイルス液とした)。

さらに、T75 培養フラスコに Sf21 細胞 1×10^7 細胞/20ml Sf-900SFM(インビトロジェン社) (抗生物質入り) を入れて、27°Cで1時間インキュベートした。細胞が接着したら二次ウイルス液 1000 μ l を添加して、27°Cで 72~96 時間培養した。培養後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 3000rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存した(この上清を三次ウイルス液とした)。加えて、100ml 用スピナーフラスコに Sf21 細胞 6×10^5 細胞/ml 濃度で 100ml を入れ、三次ウイルス液を 1ml 添加して 27°Cで約

9 6 時間培養した。培養後に、細胞及び培養液を回収した。これを 3000rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存した（この上清を四次ウイルス液とした）。

5 一次から三次までのセルペレットをソニケーションし（ソニケーション緩衝液 : 20mM HEPES pH7.5、2 % Triton X-100（商品名））細胞粗抽出液を H₂O で 20 倍にし、常法により SDS-PAGE による電気泳動について抗 FLAG M2-ペルオキシダーゼ（A-8592、SIGMA 社）を用いてウエスタンブロッティングを行い、目的とする beta3GnT-7 タンパク質の発現を確認した。その結果約 38-40kDa の位置を中心としてブロードに複数のバンド（糖鎖などの翻訳後修飾の違いによるものと考えられる）が検出、発現が確認された。

4. beta3GnT-7 のレジン精製

10 上記四次感染の FLAG-beta3GnT-7 上清 10ml に NaN₃ (0.05 %) 、 NaCl (150 mM) 、 CaCl₂ (2 mM) 、 抗 M1 レジン (Sigma 社) (50 μl) を混合し、4°Cで一夜攪拌した。翌日遠心して (3000rpm 5 分 4°C) ペレットを回収し、2 mM の CaCl₂ · TBS を 900 μl 加えて再度遠心分離 (2000rpm 5 分 4°C) し、ペレットを 200 μl の 1 mM CaCl₂ · TBS に浮遊させ活性測定のサンプル (beta3GnT-7 酵素液) とした。

5. beta3GnT-7 の受容体基質の探索

20 beta3GnT-7 は、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素類および β 1, 3-ガラクトース転移酵素類と比較して分子進化学的に解析した結果、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミニル転移酵素類に分類された。そこで、第一に供与体基質 (donor substrate) として UDP-GlcNAc を用いて検討した。

25 以下の反応系を用いて、beta3GnT-7 の受容体基質を調べた。下記反応液の「受容体基質」には、 pNp- α -Glc、 pNp- β -Glc、 pNp- α -GlcNAc、 pNp- β -GlcNAc、 pNp- α -Gal、 pNp- β -Gal、 pNp- α -GalNAc、 Bz- α -GalNAc、 pNp- α -Xyl、 pNp- β -Xyl、 pNp- α -Fuc、 Bz- α -Man、 Bz- α -ManNAc、 LacCer、 GalCer typeI、 Bz- β -lactoside (すべて Sigma 社) および Gal β 1-4GlcNAc- α -pNp (トロントリサーチケミカル社) を用いてそれぞれが受容体として機能するかどうかを調べた。

反応液 (カッコ内は最終濃度) は受容体基質 (10 nmol) 、カコジル酸ナトリ

ウム緩衝液 (pH7.2) (50mM) 、Triton CF-54(商品名) (0.4%)、MnCl₂ (10 mM) 、 UDP-GlcNAc (480 μM) 、 UDP-[¹⁴C]GlcNAc (175 nCi)、CDP-coline (5 mM) から成り、これに beta3GnT-7 酵素液を 10 μl 加えて、さらに H₂O を加えて全量 25 μl とした。

上記反応混合液を 37°C で 5 時間反応させ、反応終了後、0.1M KCl を 200 μl 加え、軽く遠心後上清を取得した。10 ml のメタノールで 1 回洗浄後、10 ml の H₂O で 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge (Waters) に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。10 ml の H₂O にて 2 回カートリッジを洗浄後、5 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 40°C のヒートブロックにて加熱しながら、窒素ガスを吹き付け蒸発乾固させた。これに、メタノール 20 μl を添加し、TLC プレート (HPTLC plate Silica gel 60 : MERCK 社製) にプロットし、クロロホルム : メタノール : 水 (0.2% CaCl₂ 含む) = 65 : 35 : 8 の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。TLC プレートの上端から 5mm の所まで展開し、プレートを乾燥後、バイオ・イメージアナライザー FLA3000 (富士写真フィルム社製) を用いて生成物に取り込まれている放射線の量を測定した。

その結果、beta3GnT-7 は Bz-β-ラクトシドおよび Galβ1-4GlcNAc-α-pNp に GlcNAc を転移させる活性を有する β1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であること、すなわち、Galβ1-4GlcNAc-R の非還元末端のガラクトースに GlcNAc を転移する酵素であることが判明した。

6. N-グリカンに対する β3GlcNAcT 活性の測定

酵素源は前記と同様にリコンビナント酵素 (FLAG 配列融合蛋白) として発現し、精製したものを使用した。アクセプター基質には表 1 に示す市販の PA 化糖鎖基質 (タカラバイオ社製) を使用し、反応条件は、14mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)、0.4% Triton CF-54、10 mM MnCl₂、50 mM UDP-GlcNAc (ドナー基質)、20 pmol. アクセプター基質、100 ng 酵素タンパク質液で 37°C、16 時間反応した。反応後 95°C、3 分で反応を止め、80 μl の水を加えて Ultragel free MC column (ウォーターズ社製) を通し、この通過液から 45 μl を HPLC

に供した。HPLC の条件は以下の通りである。尚、 UDP-GlcNAc (ドナー基質) を含まない溶液を対象として転換酵素活性 (%) を求めた。その結果を下記表 1 に示す。

・ (HPLC 条件)

5 Buffer I. a : 100 mM 酢酸/ トリエチルアミン, pH 4.0

Buffer I. b : 100 mM 酢酸/ トリエチルアミン, pH 4.0 (0.5% 1-ブタノール含有)

gradient : 5-55% : Buf. I. b (0-60 min.)、

flow rate : 1.0 ml/min.

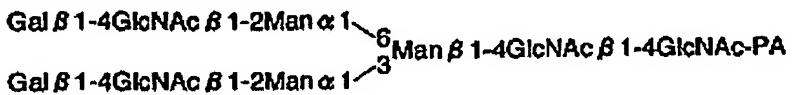
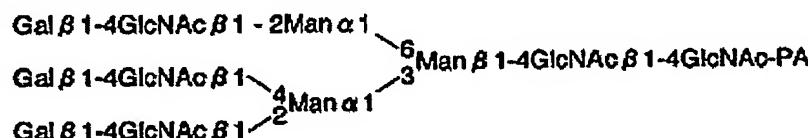
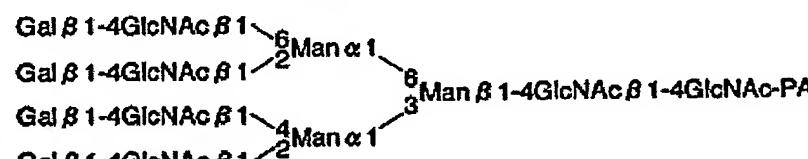
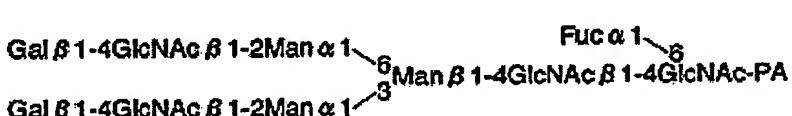
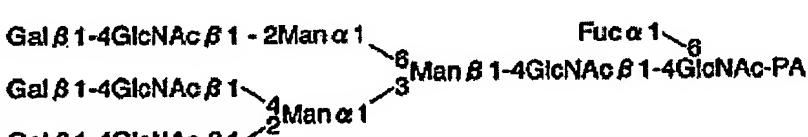
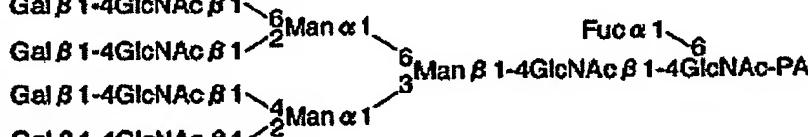
10 column : PalPak Type R (TaKaRa Cat. No. CA8000)

column oven temp : 40°C

HPLC システム: Shimadzu LC-10AD vp、CT0-10AC vp、DGU-14A、cell temp controller

検出器 : Fluorescence: RF-10AXL、UV: SPD-10Avp

表 1

アクセプター基質	転換活性(%)
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ 	18.3
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ 	26.0
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ 	20.3
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ 	20.6
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ 	17.3
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ 	18.1
$\text{Man}\alpha 1\text{-2Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc-PA}$ $\text{Man}\alpha 1\text{-3Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc-PA}$ 	0.0
$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc-PA}$	—

7. フローサイトメトリーによる酵素発現の測定

pDEST12.2 ベクター（インビトロジエン社製）に beta3GnT-7 (G10) 遺伝子を組み込んだ pDEST12.2-G10 ベクターDNAを作製した。これは具体的に次のようにして行った。下記の Invitrogen 社の gateway システムの配列を組み込んだプライマーを用いて Colo205 細胞（大腸ガン細胞）の cDNA より PCR 法で増幅後、その増幅産物をまず pDONR ベクターに BP 反応により組み込んだ。そのベクターのシーケンシングを行い、DNA 配列の確認後、pDONR ベクターから pDEST12.2 ベクターに LR 反応により入れ替えた。なお、上記操作は、Invitrogen 社製のキットに含まれるベクター、試薬を用いて商品の指示書に従い行った。

10 G10/ORF-F1 プライマー

ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctctggcgcccagagctgcgagccgct

（このうち、ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttc はベクター側の配列）

G10/ORF-R1 プライマー

ggggaccacttgtacaagaaagctgggtccatggggctcaggagcaagtgcc

（このうち、catggggctcaggagcaagtgcc から b3GnT7 遺伝子の cDNA 配列）

以上の操作により、pDEST12.2 ベクター（インビトロジエン社製）に、配列番号 5 に示す cDNA の 5' 側及び 3' 側に、上記プライマー中の、cDNA 配列以外の領域が付加された DNA 断片が挿入された組換えベクターが得られた。この組換えベクターを、常法により、HCT15 細胞株、LSC 細胞株（ともに大腸癌細胞株）に導入した。また、コントロールとして遺伝子導入のない pDEST12.2 ベクター-DNA を用いて、同様に細胞株に導入した（Mock 細胞）。0.8 mg/ml の G418 薬剤（インビトロジエン社製）によるセレクションを 1 ヶ月行った後に細胞を回収した。回収した細胞を 1% BSA/0.1% NaN₃/PBS (-) で 2 回洗った。細胞数を 1x10⁷ cells / ml にして 1 サンプルあたり 100 μl (1x10⁶ cells) 使用した。遠心後上清を除いて、10 μg/ml になるよう希釈した。下記 FITC ラベルレクチンをそれぞれ 100 μl 加え、細胞を懸濁した。4 °C で暗所（冷蔵庫）30 分反応させた後、1% BSA / 0.1% NaN₃ / PBS 100 μl をウェルに入れて洗浄を行い、1000rpm で 5 分遠心し、上清を取り除いた。さらにもう一度洗浄を繰り返した。0.5% パラホルムアルデヒ

ド/PBS 1 ml に懸濁して細胞固定を行い、ナイロンメッシュを通した後、フローサイトメトリーFACSCalibur (ベクtron ディッキンソン社製) を用いて解析した。その結果を図 1～3 に示す。

使用したレクチンは *Lycopersicon esculentum*(LEA) ならびに *Triticum vulgaris* (WGA) であり、それぞれ N-アセチルラクトサミンの繰り返し構造、ならびに N-アセチルグルコサミン構造を認識するレクチンであり、FITC により標識されているものを使用した (ホーネン、生化学工業、EY Laboratories 社などより購入)。

図 1 は、HCT15 大腸癌細胞株の LEA レクチンとの結合性を示すフローサイトメトリーの結果、図 2 は、本発明の遺伝子を導入した組換えベクター又は導入しない組換えベクター形質転換した LSC 大腸癌細胞株の LEA レクチンとの結合性を示すフローサイトメトリーの結果、図 3 は、HCT15 大腸癌細胞株の WGA レクチンとの結合性を示すフローサイトメトリーの結果を示す。各図において、太線が beta3GnT-7 遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した細胞についての結果を示し、細線が beta3GnT-7 遺伝子を含まないベクターで形質転換した細胞 (Mock 細胞) についての結果を示す。

図 1～3 に示す通り、いずれも蛍光強度がシフトしていることから、beta3GnT-7 (G10) 遺伝子を組み込んだ pDEST12.2-G10 ベクターDNA の導入細胞株では N-アセチルラクトサミン含有構造が増えている。

8. beta3GnT-7 の組織特異的発現の解析

Real Time PCR 法 (Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996) *Genome Res* 6, 995-1001) で組織での発現および株化細胞での発現状態を調べた。材料として、ヒト組織 cDNA は、Marathon cDNA (クロンテック社) を使用した。各種株化細胞は、常法に従い総 RNA を抽出して cDNA を合成した。beta3GnT-7 の検量線は、pDONRTM201 vector DNA に beta3GnT-7 遺伝子を組み込んだプラスミドを使用した。内因性の対照として恒常に発現しているグリセラアルデヒト 3 リン酸脱水素酵素 (human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) を用いた。GAPDH の検量線は、pCR2.1 (インビトロゲン社) に GAPD

H 遺伝子を組み込んだプラスミドを使用した。beta3GnT-7 用のプライマーセットおよびプローブは、RT-beta3GnT-7-F2 ; 5' -TTCTCTCAAGTGGCTGGACATC-3' , RT-beta 3GnT-7-R2 ; 5' -GCCGGTCAGCCAGAAATTG-3' , プローブ ; 5' - Fam ACTGCCACGTCCC CTTCA -MGB-3' を用いた。GAPDH のプライマーセットとプローブは、キット (Pr e-Developed TaqMan® Assay Reagents Endogenous Human GAPDH (Applied Biosystems 社)) を使用した。PCR 条件は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を使用し、1. サイクル, 50 °C, 2 分間, 続いて 1 サイクル, 95 °C, 10 分間、そして 50 サイクル ; 95 °C, 15 秒-60 °C, 1 分間を行なった。PCR 産物の定量は ABI PRISM7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。G11 の発現量は、恒常的に発現している GAPDH の転写産物量で割ることによって標準化した。表 2 にヒト組織、表 3 に株化細胞の結果をまとめる。

表2

組織名	beta3GnT-7/GAPDH
脳	0.01045
大脳皮質	0.04522
小脳	0.02345
胎児脳	0.02030
骨髓	0.01462
甲状腺	0.04084
胸腺	0.01274
脾臓	0.10108
白血球	0.07876
心臓	0.00956
骨格筋	0.00071
肺	0.12146
肝臓	0.02299
食道	0.00605
胃	0.26922
小腸	0.09333
大腸	0.07630
脾臓	0.27317
腎臓	0.01161
副腎	0.15069
乳腺	0.02560
子宮	0.07747
胎盤	0.18763
卵巣	0.11465
精巣	0.05323

beta3GnT-7 の高発現組織は、脾臓、胃、胎盤、副腎であり、中発現組織は、大腸、白血球、肺、卵巣、小腸、脾臓、精巣、子宮、大脳皮質であった。それ以外の組織では発現量が比較的低いものであった。

表3

細胞名（由来）	beta3GnT-7/ GAPDH
GOTO（神経芽腫）	0. 00012
SCCH-26（神経芽腫）	0. 00137
T98G（神経膠芽腫）	0. 00032
U251（神経膠芽腫）	0. 00023
Leukemia（前骨髓芽球性白血病）	0. 35660
Melanoma（皮膚）	0. 01255
HL-60（前骨髓芽球性白血病）	0. 17663
K562（白血病）	0. 00038
U937（単球）	0. 01617
Daudi（B細胞（Burkitt's））	0. 00437
PC-1（肺）	0. 00000
EBC-1（肺）	0. 00121
PC-7（肺）	0. 00017
HepG2（肝臓）	0. 01199
A431（食道）	0. 01031
MKN45（胃）	0. 00027
KATOIII（胃）	0. 03964
HSC43（胃）	0. 00031
Colo205（大腸）	0. 00278
HCT15（大腸）	0. 00193
LSC（大腸）	0. 00003
LSB（大腸）	0. 00128
SW480（大腸）	0. 00045
SW1116（大腸）	0. 13076
Capan-2（膵臓）	0. 03664
PA-1（子宮）	0. 00290

株化細胞での beta3GnT-7 の発現は、正常組織に比べると低下していた。前骨髓芽球性白血病由来の細胞である HL60 細胞および大腸由来の SW1116 細胞においては、発現レベルが高かった。

5 これらのことから、癌化などにより細胞の分化の程度が変化した場合、beta3GnT-7 の発現量が変化することが容易に考えられ、beta3GnT-7 の発現量の変化を調べることにより、病気の診断に利用できる可能性が考えられた。また、beta3GnT-7 には、記載したように開始点が 2 つ存在する可能性があり、スプライシングバリエントの変化を調べることによって細胞の分化状態、病的な変化を調べられる可能性もある。

9. 大腸癌患者の正常組織及び癌組織における beta3GnT-7 遺伝子の発現

実際の大腸癌 (DK) 患者の正常 (N) または癌 (T) 組織における beta3GnT-7 の発現量を「8. beta3GnT-7 の組織特異的発現の解析」に記載された方法に従い測定した。その結果を図 4 に示す。この結果から DK 3 検体を除いて、DK 10、DK 15、DK 19、DK 22、DK 23 および DK 24 検体について、癌組織では beta3GnT-7 の発現が減少する傾向が見られた。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に 1 若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ または $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを $\beta-1,3$ 結合で転移する活性を有するタンパク質。
2. 配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に 1 若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有する請求項 10 記載のタンパク質。
3. 前記タンパク質は、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列と 70% 以上の相同性を有する請求項 1 又は 2 記載のタンパク質。
4. 前記タンパク質は、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する請求項 3 記載のタンパク質。
5. 前記タンパク質は、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列又は該配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に 1 若しくは数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有する請求項 4 記載のタンパク質。
6. 前記タンパク質は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 20 記載のタンパク質。
7. 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のアミノ酸配列を有する領域を含み、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ または $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを $\beta-1,3$ 結合で転移する活性を有するタンパク質。
8. 請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする核酸。
9. 配列表の配列番号 2 又は 4 に示される塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする、請求項 8 記載の核酸。
10. 配列表の配列番号 2 又は 4 に示される塩基配列を有する請求項 9 記載の核酸。

11. 請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる組換えベクター。
12. 請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸が導入され、該核酸を発現する細胞。
- 5 13. 請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸と特異的にハイブリダイズする、該核酸の測定用核酸。
14. 請求項 10 記載の領域中の部分領域と相補的な配列を有する請求項 13 記載の測定用核酸。
15. プローブ又はプライマーである請求項 13 又は 14 記載の測定用核酸。
- 10 16. 塩基数が 15 塩基以上である請求項 15 記載の測定用核酸。
17. 癌及び／又は腫瘍の診断に用いられる請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸。
18. 消化器の癌及び／又は腫瘍の診断に用いられる請求項 17 記載の核酸測定用核酸。
- 15 19. 大腸癌の診断に用いられる請求項 18 記載の核酸測定用核酸。
20. 生体から分離された試料細胞中における、請求項 6 記載のタンパク質又はその遺伝子の発現量を調べることを含む、癌及び／又は腫瘍の診断方法。
21. 前記試料細胞が消化器由来の細胞であり、消化器の癌及び／又は腫瘍を診断する請求項 20 記載の方法。
- 20 22. 前記試料細胞が、大腸由来の細胞であり、大腸癌を診断する請求項 21 記載の方法。
23. 請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸と、請求項 6 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の核酸とを接触させることによりハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした核酸を測定することを含む、請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸の測定方法。
- 25 24. 請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸の一対をプライマーとし、請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸を鑄型として核酸増幅法を行い、増幅産物を測定することを含む、請求項 8 ないし 10 のいず

れか 1 項に記載の核酸の測定方法。

25. 請求項 6 記載のタンパク質の遺伝子の発現量を、請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸と、該遺伝子から転写された mRNA 又は該 mRNA を鑄型として生成される cDNA とを接触させることによりハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした核酸を測定することを含む、請求項 20 ないし 22 のいずれか 1 項に記載の癌及び／又は腫瘍を診断する方法。

26. 請求項 6 記載のタンパク質の遺伝子の発現量を、請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸の一対をプライマーとし、該遺伝子から転写された mRNA 又は該 mRNA を鑄型として生成される cDNA を鑄型として核酸增幅法を行い、增幅産物を測定することを含む、請求項 20 ないし 22 のいずれか 1 項に記載の癌及び／又は腫瘍を診断する方法。

27. 請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸の、請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸の測定用核酸製造のための使用。

28. 請求項 17 ないし 19 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用核酸の、癌及び／又は腫瘍の診断試薬製造のための使用。

29. 前記癌及び／又は腫瘍は、消化器の癌及び／又は腫瘍である請求項 28 記載の使用。

30. 前記消化器の癌及び／又は腫瘍は、大腸癌である請求項 29 記載の使用。

1 / 2

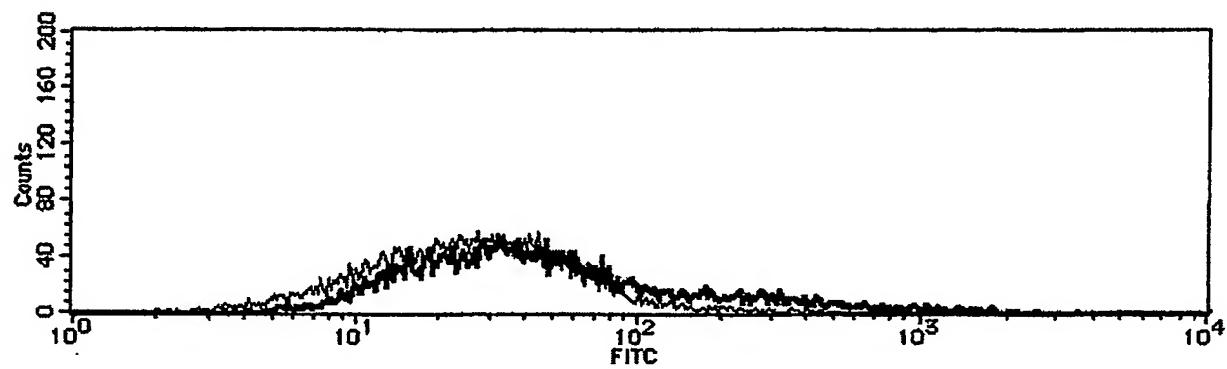


図 1

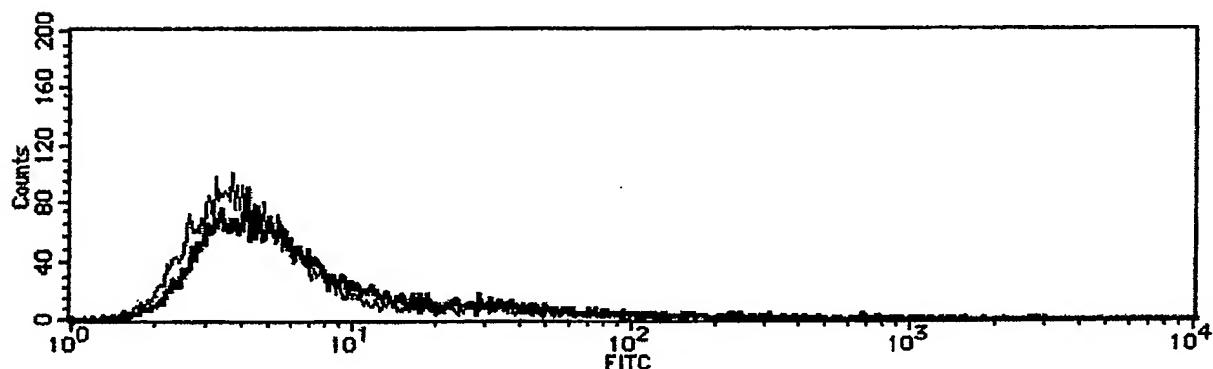


図 2

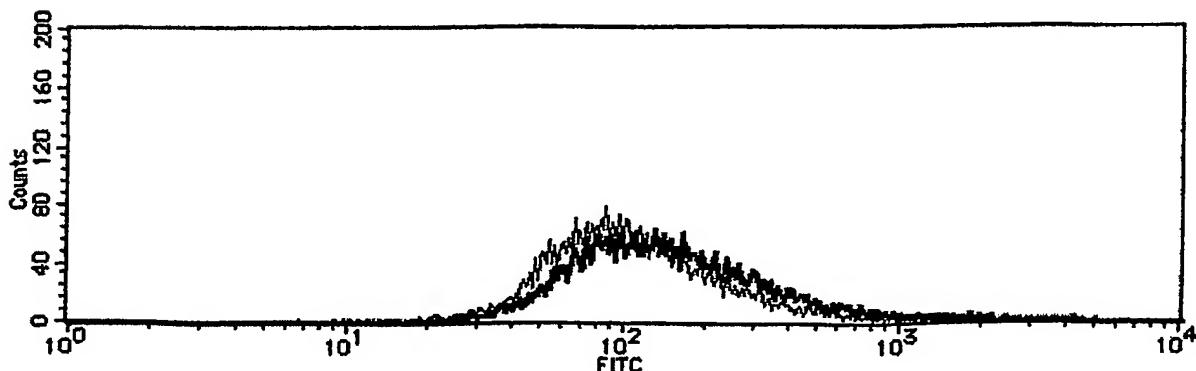


図 3

2 / 2

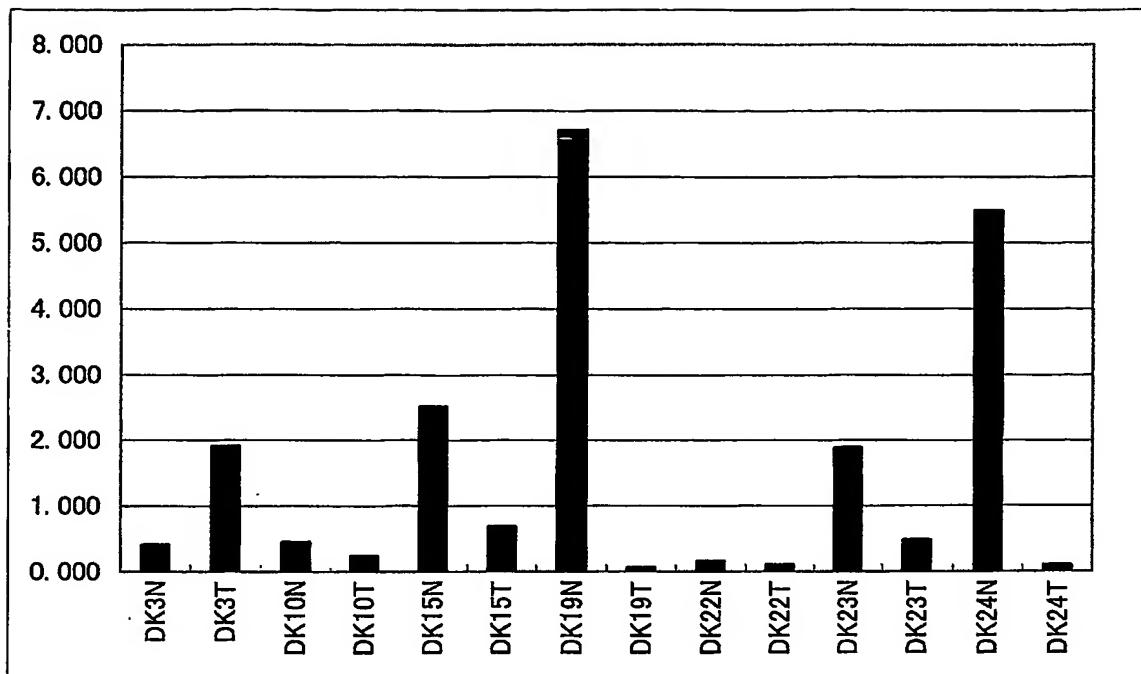


図 4

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
JAPAN GENOME SOLUTIONS INC.

<120> Novel N-acetylglucosamine transferase, nucleic acid encoding the
same and use thereof for diagnosis of cancers and/or tumors

<130> 02PF251-PCT

<160> 26

<210> 1

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val

1 5 10 15

Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg

20 25 30

Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly

35 40 45

Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys

50 55 60

Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg

65 70 75 80

Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn

85 90 95

Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys

2/27

100	105	110
Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn		
115	120	125
Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn		
130	135	140
Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys		
145	150	155
Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr		
165	170	175
Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala		
180	185	190
Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp		
195	200	205
Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr		
210	215	220
Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser		
225	230	235
Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His		
245	250	255
Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser		
260	265	270
Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu		
275	280	

<210> 2

<211> 849

<212> DNA

3/27

<213> Homo sapiens

<400> 2

tac	ttc	ccc	atg	ctg	ctg	aac	cac	ccg	gag	aag	tgc	agg	ggc	gat	gtc	48
Tyr	Phe	Pro	Met	Leu	Leu	Asn	His	Pro	Glu	Lys	Cys	Arg	Gly	Asp	Val	
1	5							10				15				
tac	ctg	ctg	gtg	gtt	gtc	aag	tgc	gtc	atc	acg	cag	cac	gac	cgc	cgc	96
Tyr	Leu	Leu	Val	Val	Val	Lys	Ser	Val	Ile	Thr	Gln	His	Asp	Arg	Arg	
20								25				30				
gag	gcc	atc	cgc	cag	acc	tgg	ggc	cgc	gag	cg	tcc	g	g	gtt	gg	144
Glu	Ala	Ile	Arg	Gln	Thr	Trp	Gly	Arg	Glu	Arg	Gln	Ser	Ala	Gly	Gly	
35					40						45					
ggc	cga	ggc	gcc	gtg	cgc	acc	ctc	ttc	ctg	ggc	acg	gcc	tcc	aag	192	
Gly	Arg	Gly	Ala	Val	Arg	Thr	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly	Thr	Ala	Ser	Lys	
50					55					60						
cag	gag	gag	cgc	acg	cac	tac	cag	cag	ctg	ctg	gcc	tac	gaa	gac	cgc	240
Gln	Glu	Glu	Arg	Thr	His	Tyr	Gln	Gln	Leu	Leu	Ala	Tyr	Glu	Asp	Arg	
65					70				75			80				
ctc	tac	ggc	gac	atc	ctg	cag	tgg	ggc	ttt	ctc	gac	acc	ttc	ttc	aac	288
Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile	Leu	Gln	Trp	Gly	Phe	Leu	Asp	Thr	Phe	Phe	Asn	
85						90					95					
ctg	acc	ctc	aag	gag	atc	cac	ttc	ctc	aag	tgg	ctg	gac	atc	tac	tgc	336
Leu	Thr	Leu	Lys	Glu	Ile	His	Phe	Leu	Lys	Trp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Cys	
100						105					110					
ccc	cac	gtc	ccc	ttc	att	ttc	aaa	ggc	gac	gat	gac	gtc	ttc	gtc	aac	384
Pro	His	Val	Pro	Phe	Ile	Phe	Lys	Gly	Asp	Asp	Asp	Val	Phe	Val	Asn	
115						120					125					
ccc	acc	aac	ctg	cta	gaa	ttt	ctg	gct	gac	cg	cag	cca	cag	gaa	aac	432

4/27

Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn
 130 135 140
 ctg ttc gtg ggc gat gtc ctg cag cac gct cgg ccc att cgc agg aaa 480
 Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys
 145 150 155 160
 gac aac aaa tac tac atc ccg ggg gcc ctg tac ggc aag gcc agc tat 528
 Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr
 165 170 175
 ccg ccg tat gca ggc ggc ggt ggc ttc ctc atg gcc ggc agc ctg gcc 576
 Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala
 180 185 190
 cgg cgc ctg cac cat gcc tgc gac acc ctg gag ctc tac cog atc gac 624
 Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp
 195 200 205
 gac gtc ttt ctg ggc atg tgc ctg gag gtg ctg ggc gtg cag ccc acg 672
 Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr
 210 215 220
 gcc cac gag ggc ttc aag act ttc ggc atc tcc cgg aac cgc aac agc 720
 Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser
 225 230 235 240
 cgc atg aac aag gag cog tgc ttt ttc cgc gcc atg ctc gtg gtg cac 768
 Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His
 245 250 255
 aag ctg ctg ccc cct gag ctg ctc gcc atg tgg ggg ctg gtg cac agc 816
 Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser
 260 265 270
 aat ctc acc tgc tcc cgc aag ctc cag gtg ctc 849

5/27

Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu

275 280

<210> 3

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys Ser

1 5 10 15

Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro

20 25 30

Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met

35 40 45

Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val

50 55 60

Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg

65 70 75 80

Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly Arg Gly Ala

85 90 95

Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg

100 105 110

Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp

115 120 125

Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys

130 135 140

Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro

6/27

145	150	155	160
Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu			
165	170	175	
Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly			
180	185	190	
Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr			
195	200	205	
Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala			
210	215	220	
Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His			
225	230	235	240
His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu			
245	250	255	
Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly			
260	265	270	
Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys			
275	280	285	
Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro			
290	295	300	
Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys			
305	310	315	320
Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu			
325			

<210> 4

<211> 981

<212> DNA

7/27

<213> Homo sapiens

<400> 4

gcc tct cag ggg ccc cag gcc tgg gac gtg acc acc act aac tgc tca	48
Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys Ser	
1 5 10 15	
gcc aat atc aac ttg acc cac cag ccc tgg ttc cag gtc ctg gag ccg	96
Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro	
20 25 30	
cag ttc cgg cag ttt ctc ttc tac cgc cac tgc cgc tac ttc ccc atg	144
Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met	
35 40 45	
ctg ctg aac cac ccg gag aag tgc agg ggc gat gtc tac ctg ctg gtg	192
Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val	
50 55 60	
gtt gtc aag tcg gtc atc acg cag cac gac cgc cgc gag gcc atc cgc	240
Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg	
65 70 75 80	
cag acc tgg ggc cgc gag cgg cag tcc gcg ggt ggg ggc cga ggc gcc	288
Gln Thr Trp Gly Arg Gln Ser Ala Gly Gly Arg Gly Ala	
85 90 95	
gtg cgc acc ctc ttc ctg ctg ggc acg gcc tcc aag cag gag gag cgc	336
Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg	
100 105 110	
acg cac tac cag cag ctg ctg gcc tac gaa gac cgc ctc tac ggc gac	384
Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp	
115 120 125	
atc ctg cag tgg ggc ttt ctc gac acc ttc aac ctg acc ctc aag	432

8/27

Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys
130 135 140
gag atc cac ttc ctc aag tgg ctg gac atc tac tgc ccc cac gtc ccc 480
Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro
145 150 155 160
ttc att ttc aaa ggc gac gat gac gtc ttc gtc aac ccc acc aac ctg 528
Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu
165 170 175
cta gaa ttt ctg gct gac cgg cag cca cag gaa aac ctg ttc gtg ggc 576
Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly
180 185 190
gat gtc ctg cag cac gct cgg ccc att cgc agg aaa gac aac aaa tac 624
Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr
195 200 205
tac atc ccg ggg gcc ctg tac ggc aag gcc agc tat cog ccg tat gca 672
Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala
210 215 220
ggc ggc ggt ggc ttc ctc atg gcc ggc agc ctg gcc cgg cgc ctg cac 720
Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His
225 230 235 240
cat gcc tgc gac acc ctg gag ctc tac ccg atc gac gac gtc ttt ctg 768
His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu
245 250 255
ggc atg tgc ctg gag gtg ctg ggc gtg cag ccc acg gcc cac gag ggc 816
Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly
260 265 270
ttc aag act ttc ggc atc tcc cgg aac cgc aac agc cgc atg aac aag 864

9/27

Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys
275 280 285
gag ccg tgc ttt ttc cgc gcc atg ctc gtg gtg cac aag ctg ctg ccc 912
Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro
290 295 300
cct gag ctg ctc gcc atg tgg ggg ctg gtg cac agc aat ctc acc tgc 960
Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys
305 310 315 320
tcc cgc aag ctc cag gtg ctc 981
Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu
325

<210> 5

<211> 1206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atg tcg ctg tgg aag aaa acc gtc tac cgg agt ctg tgc ctg gcc ctg 48
Met Ser Leu Trp Lys Lys Thr Val Tyr Arg Ser Leu Cys Leu Ala Leu
1 5 10 15
gcc ctg ctc gtg gcc gtg acg gtg ttc caa cgc agt ctc acc cct ggt 96
Ala Leu Leu Val Ala Val Thr Val Phe Gln Arg Ser Leu Thr Pro Gly
20 25 30
cag ttt ctg cag gag cct ccg cca ccc acc ctg gag cca cag aag gcc 144
Gln Phe Leu Gln Glu Pro Pro Pro Pro Thr Leu Glu Pro Gln Lys Ala
35 40 45
cag aag cca aat gga cag ctg gtg aac ccc aac aac ttc tgg aag aac 192

10/27

Gln Lys Pro Asn Gly Gln Leu Val Asn Pro Asn Asn Phe Trp Lys Asn
50 55 60
cog aaa gat gtg gct gcg ccc acg ccc atg gcc tct cag ggg ccc cag 240
Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro Thr Pro Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln
65 70 75 80
gcc tgg gac gtg acc acc act aac tgc tca gcc aat atc aac ttg acc 288
Ala Trp Asp Val Thr Thr Asn Cys Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr
85 90 95
cac cag ccc tgg ttc cag gtc ctg gag ccg cag ttc cgg cag ttt ctc 336
His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu
100 105 110
ttc tac cgc cac tgc cgc tac ttc ccc atg ctg ctg aac cac ccg gag 384
Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu
115 120 125
aag tgc agg ggc gat gtc tac ctg ctg gtg gtt gtc aag tcg gtc atc 432
Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile
130 135 140
acg cag cac gac cgc cgc gag gcc atc cgc cag acc tgg ggc cgc gag 480
Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu
145 150 155 160
cgg cag tcc gcg ggt ggg ggc cga ggc gcc gtg cgc acc ctc ttc ctg 528
Arg Gln Ser Ala Gly Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu
165 170 175
ctg ggc acg gcc tcc aag cag gag gag cgc acg cac tac cag cag ctg 576
Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu
180 185 190
ctg gcc tac gaa gac gac cgc ctc tac ggc gac atc ctg cag tgg ggc ttt 624

11/27

Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe
195 200 205
ctc gac acc ttc ttc aac ctg acc ctc aag gag atc cac ttc ctc aag 672
Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys
210 215 220
tgg ctg gac atc tac tgc ccc cac gtc ccc ttc att ttc aaa ggc gac 720
Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp
225 230 235 240
gat gac gtc ttc gtc aac ccc acc aac ctg cta gaa ttt ctg gct gac 768
Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp
245 250 255
cgg cag cca cag gaa aac ctg ttc gtg ggc gat gtc ctg cag cac gct 816
Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala
260 265 270
cgg ccc att cgc agg aaa gac aac aaa tac tac atc ccg ggg gcc ctg 864
Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu
275 280 285
tac ggc aag gcc agc tat ccg ccg tat gca ggc ggc ggt ggc ttc ctc 912
Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Phe Leu
290 295 300
atg gcc ggc agc ctg gcc cgg cgc ctg cac cat gcc tgc gac acc ctg 960
Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu
305 310 315 320
gag ctc tac ccg atc gac gac gtc ttt ctg ggc atg tgc ctg gag gtg 1008
Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val
325 330 335
ctg ggc gtg cag ccc acg gcc cac gag ggc ttc aag act ttc ggc atc 1056

12/27

Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile
 340 345 350
 tcc cg_g aac cg_c aac agc cg_c atg aac aag gag cc_g tg_c ttt tt_c cg_c 1104
 Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg
 355 360 365
 gc_c atg ct_c gt_g gt_g cac aag ct_g ct_g cc_c cc_t gag ct_g ct_c gc_c atg 1152
 Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met
 370 375 380
 tg_g gg_g ct_g gt_g cac agc aat ct_c acc tg_c tcc cg_c aag ct_c cag gt_g 1200
 Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val
 385 390 395 400
 ct_c tga 1206
 Leu

<210> 6

<211> 2228

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

cccagggcct cgccgccttc cgggtgcacc ccccgacctc ccccg_{cc} gc_{ct} cgg_{tt} gg 60
 gcggcttccc tg_{ga} accccct agggctggca gggccggatc cggagccctc cg_{ttt} cctcc 120
 cggagagct ggac_{tt} ggg tcacaccccc cagc_{ct} gcac ctaagg_{tg} cc_c ctgtttcc 180
 tccaaccaca tgccccagca ac_{ct} ggg_{gg} ac cctatggga aaatgtcgct ctatggg_{gt} 240
 cagc_{ct} gc_{at} tcac_{cc} tgg gc_{ct} ggac_{ct} gcaaccggac cagc_{cc} tc_{ag} ggcaaccc_{cg} 300
 gc_{gt} ctccac gggctgcctg tctctc_{ct} tgg caccctgctc ctccccctt_g gaggtcagcg 360
 ccatctctct gctaggctgg cc_{ct} tgg_{aa} agg cc_{act} ct_{gt} ct g_t ccc_{cc} agag ct_{ct} cagccc 420
 ccagg_{gt} ctcc actggggagg gtggggcagg tgc_{ct} tggca gccccggag ggtgagatga 480

13/27

agagaggagg	tccttcagga	caggggctca	ggccccaggg	tttgggacga	ccagcactcc	540							
tggcagagag	ctctaatttc	tgcttccgaa	atgggtgtgg	accggggttg	gggtgggggg	600							
gtctctggc	aagaagggtc	cctcaaggc	tggagctgca	aatgtcccc	ctcccaggga	660							
gttagagctgt	agcctcatgt	cttctaattgg	ggtgatgtatga	gttggggatg	ttaaggttagg	720							
ggtgaggggc	agtgccatgc	tagaggtgct	cactgcatcc	ttgggcctcc	atcaaccatg	780							
agggctgctc	tttgggtgggt	gagacagact	ggagaagggg	gaggagggcc	agtcttcctc	840							
aggtcccaag	ctcgagccac	tctccaaatgt	gccccacatg	tgtggagct	cccgccggc	900							
acagaggatc	agagggtgcc	ctctcaatga	ctctggctct	gagtcaccta	atgataaccga	960							
tacctactgc	tgtgggttagg	tacaccgcag	ggaaatgaaa	ggcattgggg	ttccaggcgt	1020							
gggaaacagg	gcagagggttt	ccacctgagg	ccctcctgtt	aaggtgacag	cattccctta	1080							
actgtgcacc	cgtgcctgg	tactttatata	agcactccaa	tcctgtgttt	tagccccatt	1140							
tggggaaaga	agaaatcgtg	gctcagagtg	gttgtaaacc	actcattcag	tttgtaaagcg	1200							
tcagggcctg	attccacagt	gctccttgag	gagagggcag	ggtggggagaa	agaaaggcga	1260							
gggtgggaga	ggaagcggga	ccctaccctg	acagcttagg	gactccggga	ctgagcctgt	1320							
gcccagggtcc	acttgcccg	ctgggaccac	ccagcctccc	aaggggggcg	ccaggagagc	1380							
cctgggctca	tctttctct	ctcctctgt	ctgtccgctc	tccccacag	gaagaaaacc	1440							
gtctacccgga	gtctgtgcct	ggccctggcc	ctgctgtgg	ccgtgacgg	gttccaaacgc	1500							
agtctcaccc	ctggtcagtt	tctgcaggag	cctccgcccc	ccaccctgg	gccacagaag	1560							
gcccagaagc	caaattggaca	gctggtgaac	cccaacaact	tctggaaagaa	cccgaaagat	1620							
gtggctgcgc	ccacgccc	atg	gcc	tct	cag	ggg	ccc	cag	gcc	tgg	gac	gtg	1671

Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val

1 5 10

acc acc act aac tgc tca gcc aat atc aac ttg acc cac cag ccc tgg 1719

Thr Thr Thr Asn Cys Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp

ttc cag gtc ctg gag ccg cag ttc cgg cag ttt ctc ttc tac cgc cac 1767

Phe Gin Val Leu Glu Pro Gin Phe Arg Gin Phe Leu Phe Tyr Arg His

14/27

30	35	40	
tgc cgc tac ttc ccc atg ctg ctg aac cac cac ccg gag aag tgc agg ggc			1815
Cys Arg Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly			
45	50	55	
gat gtc tac ctg ctg gtg gtt gtc aag tgc gtc atc acg cag cac gac			1863
Asp Val Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp			
60	65	70	75
cgc cgc gag gcc atc cgc cag acc tgg ggc cgc gag cgg cag tcc gcg			1911
Arg Arg Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala			
80	85	90	
ggg ggc cga ggc gcc gtg cgc acc ctc ttc ctg ctg ggc acg gcc			1959
Gly Gly Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala			
95	100	105	
tcc aag cag gag gag cgc acg cac tac cag cag ctg ctg gcc tac gaa			2007
Ser Lys Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu			
110	115	120	
gac cgc ctc tac ggc gac atc ctg cag tgg ggc ttt ctc gac acc ttc			2055
Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe			
125	130	135	
ttc aac ctg acc ctc aag gag atc cac ttc ctc aag tgg ctg gac atc			2103
Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile			
140	145	150	155
tac tgc ccc cac gtc ccc ttc att ttc aaa ggc gac gat gac gtc ttc			2151
Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe			
160	165	170	
gtc aac ccc acc aac ctg cta gaa ttt ctg gct gac cgg cag cca cag			2199
Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln			

15/27

175 180 185

gaa aac ctg ttc gtg ggc gat gtc ctg ca 2228

Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu

190 195

<210> 7

<211> 848

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cag cag ctg ctg gcc tac gaa gac cgc ctc tac ggc gac atc ctg cag 48

Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln

1 5 10 15

tgg ggc ttt ctc gac acc ttc aac ctg acc ctc aag gag atc cac 96

Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His

20 25 30

ttc ctc aag tgg ctg gac atc tac tgc ccc cac gtc ccc ttc att ttc 144

Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe

35 40 45

aaa ggc gac gat gac gtc ttc gtc aac ccc acc aac ctg cta gaa ttt 192

Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe

50 55 60

ctg gct gac cgg cag cca cag gaa aac ctg ttc gtg ggc gat gtc ctg 240

Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu

65 70 75 80

cag cac gct cgg ccc att cgc agg aaa gac aac aaa tac tac atc cgg 288

Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro

16/27

85	90	95	
ggg gcc ctg tac ggc aag gcc agc tat ccg ccg tat gca ggc ggc ggt			336
Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly			
100	105	110	
ggc ttc ctc atg gcc ggc agc ctg gcc ccg cgc ctg cac cat gcc tgc			384
Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His His Ala Cys			
115	120	125	
gac acc ctg gag ctc tac ccg atc gac gac gtc ttt ctg ggc atg tgc			432
Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys			
130	135	140	
ctg gag gtg ctg ggc gtg cag ccc acg gcc cac gag ggc ttc aag act			480
Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly Phe Lys Thr			
145	150	155	160
ttc ggc atc tcc ccg aac cgc aac agc cgc atg aac aag gag ccg tgc			528
Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys			
165	170	175	
ttt ttc cgc gcc atg ctc gtg gtg cac aag ctg ctg ccc cct gag ctg			576
Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu			
180	185	190	
ctc gcc atg tgg ggg ctg gtg cac agc aat ctc acc tgc tcc cgc aag			624
Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys			
195	200	205	
ctc cag gtg ctc tgaccccagc cgggctacta ggacaggcca gggcacttgc			676
Leu Gln Val Leu			
210			
tcctgagccc ccatggatt gggctggag ccacagtgcc caggcctagc ctttggtccc			736
caaggggagg tggagggttg aggcctacgt gccactgggt gtggtgggt gcaggtagcc			796

17/27

agaaaaggac ctccctgtgt ggataattct agggaaactga ggcccaggaa cg 848

<210> 8

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atg gcc tct cag ggg ccc cag gcc tgg gac gtg acc acc act aac tgc 48

Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val Thr Thr Asn Cys

1 5 10 15

tca gcc aat atc aac ttg acc cac cag ccc tgg ttc cag gtc ctg gag 96

Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu

20 25 30

ccg cag ttc cgg cag ttt ctc ttc tac cgc cac tgc cgc tac ttc ccc 144

Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro

35 40 45

atg ctg ctg aac cac ccg gag aag tgc agg ggc gat gtc tac ctg ctg 192

Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu

50 55 60

gtg gtt gtc aag tcg gtc atc acg cag cac gac cgc cgc gag gcc atc 240

Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile

65 70 75 80

cgc cag acc tgg ggc cgc gag cgg cag tcc gcg ggt ggg ggc cga ggc 288

Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly Gly Arg Gly

85 90 95

gcc gtg cgc acc ctc ttc ctg ggc acg gcc tcc aag cag gag gag 336

18/27

Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu
100 105 110
cgc acg cac tac cag cag ctg ctg gcc tac gaa gac cgc ctc tac ggc 384
Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly
115 120 125
gac atc ctg cag tgg ggc ttt ctc gac acc ttc ttc aac ctg acc ctc 432
Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu
130 135 140
aag gag atc cac ttc ctc aag tgg ctg gac atc tac tgc ccc cac gtc 480
Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val
145 150 155 160
ccc ttc att ttc aaa ggc gac gat gac gtc ttc gtc aac ccc acc aac 528
Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn
165 170 175
ctg cta gaa ttt ctg gct gac cgg cag cca cag gaa aac ctg ttc gtg 576
Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val
180 185 190
ggc gat gtc ctg cag cac gct cgg ccc att cgc agg aaa gac aac aaa 624
Gly Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys
195 200 205
tac tac atc ccg ggg gcc ctg tac ggc aag gcc agc tat ccg ccg tat 672
Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr
210 215 220
gca ggc ggc ggt ggc ttc ctc atg gcc ggc agc ctg gcc cgg cgc ctg 720
Ala Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu
225 230 235 240
cac cat gcc tgc gac acc ctg gag ctc tac ccg atc gac gac gtc ttt 768

19/27

His His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe
245 250 255
ctg ggc atg tgc ctg gag gtg ctg ggc gtg cag ccc acg gcc cac gag 816
Leu Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu
260 265 270
ggc ttc aag act ttc ggc atc tcc cgg aac cgc aac agc cgc atg aac 864
Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn
275 280 285
aag gag ccg tgc ttt ttc cgc gcc atg ctc gtg gtg cac aag ctg ctg 912
Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu
290 295 300
ccc cct gag ctg ctc gcc atg tgg ggg ctg gtg cac agc aat ctc acc 960
Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr
305 310 315 320
tgc tcc cgc aag ctc cag gtg ctc tga 987
Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu
325

<210> 9

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Leu Trp Lys Lys Thr Val Tyr Arg Ser Leu Cys Leu Ala Leu
1 5 10 15
Ala Leu Leu Val Ala Val Thr Val Phe Gln Arg Ser Leu Thr Pro Gly
20 25 30

20/27

Gln Phe Leu Gln Glu Pro Pro Pro Pro Thr Leu Glu Pro Gln Lys Ala
35 40 45
Gln Lys Pro Asn Gly Gln Leu Val Asn Pro Asn Asn Phe Trp Lys Asn
50 55 60
Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro Thr Pro Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln
65 70 75 80
Ala Trp Asp Val Thr Thr Asn Cys Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr
85 90 95
His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu
100 105 110
Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu
115 120 125
Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile
130 135 140
Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu
145 150 155 160
Arg Gln Ser Ala Gly Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu
165 170 175
Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu
180 185 190
Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe
195 200 205
Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys
210 215 220
Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp
225 230 235 240
Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp

21/27

245

250

255

Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala

260

265

270

Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu

275

280

285

Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Phe Leu

290

295

300

Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu

305

310

315

320

Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val

325

330

335

Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile

340

345

350

Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg

355

360

365

Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met

370

375

380

Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val

385

390

395

400

Leu

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

22/27

<400> 10

cagcagctgc tggctacga agac

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

gcacatgccc agaaagacgt cgtc

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 12

cgttcctggg cctcagtttc ctag

24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

23/27

<400> 13

gaccgacttg acaaccacca gca 23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 14

gttagacatcg cccctgcact tct 23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

gcccagagct gcgagccgct 20

<210> 16

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

24/27

<400> 16

gcacatgccc agaaagacgt cg

22

<210> 17

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 17

ggggacaagt ttgtacaaaa aaggcaggctt cgcctctcag gggccccagg cct

53

<210> 18

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc catggggct caggagcaag tgcc

54

<210> 19

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for PCR

25/27

<400> 19

gatcatgcat tttcaagtgc agatttcag cttcctgcta atcagtgcc cagtcataat 60
gtcacgtgga gattacaagg acgacgatga caag 94

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 20

cgggatccat gcattttcaa gtgcag 26

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 21

ggaattcttg tcatcgctgt ccttg 25

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

26/27

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 22

ttcctcaagt ggctggacat c

21

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 23

gccggtcagc cagaaattc

19

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide probe

<400> 24

actcccccca cgtcccccttc a

21

<210> 25

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

27/27

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 25

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt ctggcgccca gagctgcgag ccgct 55

<210> 26

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 26

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc catggggct caggagcaag tgcc 54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N9/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N9/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	Akira TOGAYACHI et al., Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide beta 1,3-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids, The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, No.25, pages 22032 to 22040	1-19, 23, 24, 27-30
Y	WO 02/26950 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 04 April, 2002 (04.04.02), & EP 0463395 A1	1-19, 23, 24, 27-30

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 16 May, 2003 (16.05.03)	Date of mailing of the international search report 03 June, 2003 (03.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03044

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Norihiko SHIRAI SHI, Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-acetylglucosaminylytransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family, The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, No.5, pages 3498 to 3507	1-19, 23, 24, 27-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03044

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 20-22, 25, 26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 20 to 22, 25 and 26 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body or animal body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a)(i) of the PCT and (continued to extra sheet)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03044

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.